婚飞行为影响中华蜜蜂性成熟处女蜂王的基因表达

吴小波，王子龙，张 飞，石元元，曾志将*
（江西农业大学蜜蜂研究所，南昌 330045）

摘要：婚飞是性成熟处女蜂王与雄蜂交配过程中的一个重要前奏，在该过程中蜂王体内伴随着一系列重要的生理变化。为了探究中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 处女蜂王婚飞过程中基因表达变化，本研究利用数字基因表达谱（digital gene expression，DGE）技术分析了中华蜜蜂性成熟处女蜂王飞行与未飞行之间的基因表达差异。经 DGE 测序，分别从两个样品中获得 5.98 和 6.01 百万条 Clean 标签。通过分析检测到 250 个基因有差异表达，其中 133 个基因在飞行蜂王中上调表达，117 个基因在飞行蜂王中下调表达。这些差异基因可以归类到 348 个功能性类别和 142 个生化途径。结果表明中华蜜蜂性成熟处女蜂王在婚飞过程中大量基因的表达发生了变化。这些结果为进一步研究中华蜜蜂蜂王婚飞过程中生理变化的分子机制提供了重要的基因表达信息。

关键词：中华蜜蜂；蜂王；飞行行为；数字基因表达谱；基因表达；婚飞
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2013)05-0486-08

Mating flight behaviour affects gene expression in matured virgin queens of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae)

WU Xiao-Bo, WANG Zi-Long, ZHANG Fei, SHI Yuan-Yuan, ZENG Zhi-Jiang* (Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: Queen mating flight is an important prelude of sexual matured virgin queens mating with drones, which is usually accompanied by a series of important physiological changes in queens' bodies. In order to explore the differences of gene expression following queen mating flight behaviour, we analyzed the gene expression differences between the flying matured virgin queens and non-flying matured virgin queens of *Apis cerana cerana* using a high-throughput sequencing method. Through digital gene expression (DGE) sequencing, we obtained 5.98 and 6.01 million clean tags from the flying matured virgin queen and non-flying matured virgin queen samples, respectively. A total of 250 genes were differentially expressed between both, with 133 up-regulated and 117 down-regulated in the flying matured virgin queens. These differentially expressed genes can be classified into 348 functional categories and involved in 142 biochemical pathways, indicating that there are a large number of genes whose expression levels change during mating flight process of matured virgin queens. The results provide important gene expression information for further researching the molecular mechanisms of the physiological changes during queen mating flight in *A. cerana cerana*.

Key words: *Apis cerana cerana*; queen; flight behaviour; digital gene expression (DGE); gene expression; mating flight

蜜蜂是与人类以及大自然关系密切的社会性昆虫，它不仅可以为人类提供营养丰富的蜂产品，而且通过授粉模式维持生态平衡，对保护和维持生物多样性起着重要作用。不仅如此，蜜蜂是继果蝇后又一个重要的模式昆虫，被广泛应用于学习记忆、毒理安全以及社会行为学研究(曾志将，2009)。随着分子生物学技术的发展，蜜蜂分子生物学研究也取得了一系列成果。尤其是 2006 年 10 月绘制完成西方蜜蜂 *Apis mellifera* 基因组全序列图谱后，科研人员开展了大量的后基因组学的研究，对中华蜜蜂 *A. cerana cerana* 和意大利蜜蜂 *A. mellifera ligustica* 分子生物学作了较为深入的比较研究。高通量测序

基金项目：国家自然科学基金项目(31060327)；江西省研究生创新基金项目(YC2011-B016)；江西农业大学青年科学基金项目(2010-09003303)
作者简介：吴小波，男，1983 年生，江西进贤人，博士研究生，讲师，主要从事养蜂学教学与研究工作，E-mail：wuxiaobo21@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：bees1965@sina.com
收稿日期 Received：2012-12-13；接受日期 Accepted：2013-04-02

技术(high-throughput sequencing)又称“下一代”测序技术，以能一次并行对几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测定为标志，可以同时完成传统基因组学研究(测序和注释)以及功能基因组学(基因表达及调控，基因功能，蛋白/核酸相互作用)研究(刘亭亭，2012；贺华良等，2012)。数字基因表达谱(digital gene expression，DGE)就是利用新一代高通量测序技术和高性能计算分析技术来全面、快速地检测某一物种特定组织特定条件下的基因表达情况，该技术目前已成功应用于蜜蜂分子生物学研究当中，并发现不同蜂种同一生理时期以及同一蜂种不同生理时期蜜蜂的基因表达存在差异(Kocher *et al.*，2008，2010；Liu *et al.*，2011；Wang *et al.*，2012)。

蜂王是蜜蜂蜂群当中的主要繁殖个体，其生理情况随日龄和交配行为而改变。Kocher 等(2008，2010)比较分析了处女蜂王、刚授精蜂王以及产卵蜂王的转录组，分析发现它们之间存在大量差异，而且处女蜂王授精方式对其基因表达也有一定的影响。然而，目前对于中华蜜蜂处女蜂王的分子生物学比较研究报道较少，引人关注的是，性成熟处女蜂王在蜂群内不会吸引雄蜂进行交配，但在空中进行婚飞时却能吸引雄蜂与之交配，表明处女蜂王在婚飞时可能产生了某些内在生理变化从而吸引了雄蜂的进行交配。本研究利用数字基因表达谱技术比较分析婚飞对中华蜜蜂性成熟期处女蜂王 mRNA 表达的影响，结果如下。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

试验蜂群为江西农业大学蜜蜂研究所饲养的中华蜜蜂 *A. cerana cerana*。群势均为 5 脾蜂，蜂脾相称。

1.2　样品的采集

按照标准的人工育王方法(曾志将，2009)培育中华蜜蜂蜂王，待蜂王性成熟后进行单雄人工授精。并以此蜂群为母本群提供小幼虫，进一步进行人工育王，将新出房的处女王囚入王笼并放入无王区。处女蜂王出房 12 d 后，将其中 6 头处女蜂王分别放入含有几百头雄蜂和工蜂的网罩(长×宽×高 =3 m×4 m×5 m)中，飞行 20 min 后采集飞行处女蜂王，立即与另外 6 头同批次未飞行的处女蜂王一起放入 -80℃ 冷冻处理 5 min，用解剖剪从蜂王侧面解剖并剔除蜂王体内的消化道，每 2 头蜂王为一个样品，放入 -80℃ 冰箱保存，待提取 RNA。

1.3　创建 DGE 文库并测序

用 SV 总 RNA 解离系统(Promega 公司，美国)分别提取中华蜜蜂性成熟处女蜂王每个样品的总 RNA，并进行 RNA 质量检测。待样品检验合格后，分别将中华蜜蜂性成熟处女蜂王的总 RNA 平行样品混合，制备飞行蜂王和未飞行蜂王试验样品。分别取 6 μg 总 RNA，利用 Oligo(dT)磁珠富集总 RNA 中的 mRNA，并以 Oligo(dT)为引导逆转录为双链 cDNA，采用 4 碱基识别酶 *Nla* Ⅲ 酶切双链 cDNA，连接上 Illumina adaptor 1，利用 *Mme* Ⅰ 酶切 3′端 CATG 下游 17 bp 碱基，并在 3′端连接上 Illumina adaptor 2。再加入 Primer GX1 和 Primer GX2 进行 15 个循环的 PCR 扩增。扩增产物通过 6% TBE PAGE 胶回收 95 碱基条带，纯化后的片段用 Illumina HiSeq™ 2000 测序仪(Illumina 公司，美国)进行测序。测序产生数百万条原始 Reads，Reads 的测序读长为 49 bp。

1.4　DGE 标签与意大利蜜蜂基因序列的比对分析

测序得到的原始图像数据经读取测序峰图转化为序列数据，称之为原始数据或原始 reads，以 fastq 文件格式存储，里面存储 reads 的序列以及 reads 的测序质量。为了获得理想的序列数据，原始数据经过去除空载 reads(只含 3′接头而找不到标签序列的 reads)、去除 3′接头序列(由于标签只有 21 nt 而测序 read 长度为 49 nt，原始 read 上带有一段 3′接头序列)、去除低质量标签(含有未知碱基 N 的标签)、去除长度过小或过大的标签，取长度为 21 nt 的标签、去除拷贝数为 1 的标签(可能是测序错误)，从而获得包含 CATG 的 21 bp 标签序列的 Clean 标签。

从 NCBI (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Apis_mellifera)下载意大利蜜蜂所有基因的 mRNA 序列，利用软件检索 mRNA 上所有的 CATG 位点，生成 CATG +17 nt 碱基的参考标签数据库。然后将试验获取的全部 Clean Tag 与参考标签数据库进行比对，允许最多一个碱基错配，对其中唯一比对到一个基因的标签(unambiguous tags)进行基因注释，统计每个基因对应的原始 Clean Tag 数，然后对原始 Clean Tag 数做标准化(TPM)处理，标准化方法为：每个基因包含的原始 Clean Tag 数/该样本中总 Clean Tag 数×1 000 000，从而获得标准化的基因表达量。

1.5　差异表达基因的筛选

根据 Audic 和 Claverie (1997)描述的数字化基

因表达谱差异基因检测方法，筛选飞行蜂王和未飞行蜂王两样本间的差异表达基因。在多重假设检验校正和分析中 FDR 被用来确定 P 值的域值。我们用 FDR≤0.001 且倍数差异在 2 倍及以上作为临界值去分析差异表达基因。在此基础上进行 Gene Ontology 功能显著性富集分析和 KEGG Pathway 显著性富集分析。

1.6 数据统计与分析

参照 Audic 和 Claverie (1997)描述的方法，假设观测到某基因对应的 Clean 标签数为 x，已知在文库中，每个基因的表达量只占所有基因表达量的一小部分，在此情况下，$p(x)$的分布服从泊松分布：

$$p(x) = \frac{e^{-\lambda}\lambda^{x}}{x!} \quad (\lambda \text{ 为基因 A 的真实转录数})$$

已知，样本 1 总 Clean 标签数为 $N1$，样本 2 总 Clean 标签数为 $N2$，某基因 A 在样本 1 中对应的 Clean 标签数为 x，在样本 2 中对应的 Clean 标签数为 y，则此基因 A 在两样本中表达量相等的概率由以下公式来计算：

$$2\sum_{i=0}^{i=y} p(i \mid x)$$

$$\text{或} 2 \times (1 - \sum_{i=0}^{i=y} p(i \mid x)) \quad (\text{如果} \sum_{i=0}^{i=y} p(i \mid x) > 0.5)$$

$$p(y \mid x) = (\frac{N_2}{N_1})^{y} \frac{(x+y)!}{x!y!(1+\frac{N_2}{N_1})^{(x+y+1)}}$$

假设挑选了 M 个差异表达基因，其中 O 个是真正有差异表达的基因，另外 N 个是其实没有差异表达的基因，为假阳性。错误比例 S = N/M 平均而言不应超过某个临界值，在统计时预先设定其 FDR 值不能超过 1%。在获得差异检验的 FDR 值时，也根据基因的表达量(RPKM 值)计算此基因在不同样本间的差异表达倍数。差异倍数越大，FDR 值越小，就表明表达差异越显著。在此分析中，差异表达基因被定义为 FDR≤1‰且倍数差异在 2 倍以上(含 2 倍)的基因。

2 结果与分析

2.1 中华蜜蜂飞行蜂王与未飞行蜂王 DGE 序列分析

分别构建中华蜜蜂飞行蜂王(flying matured virgin queen, FMVQ)和未飞行蜂王(non-flying matured virgin queen, NFMVQ)的 DGE 数据库并测序，分别获得 6 104 196 和 6 123 579 条原始标签。过滤排除低质量的标签后，每个数据库获得的总 Clean 标签数分别是 5 980 022 和 6 010 094(表 1)，这些 Clean 标签分别占总标签数的 97.97% 和 98.15%(图 1)。拷贝数大于 100 的标签的总数在 Clean 标签之中所占的比例超过 77%，但是它们的种类在 Clean 标签种类中的分布不超过 6%，拷贝数在 2 ~5 之间的标签种类在 Clean 标签种类中的分布比较广泛(图 2)。表达谱测序饱和度分析用于检查检测到的基因数目是否随着测序量(标签数量，total tag number)的增加而增加并且趋于饱和。如图 3 所示，当两数据库的测序量达到接近 2 M 时，检测到的基因数目趋于饱和。

2.2 DGE 序列比对到意大利蜜蜂基因序列

由于目前 GenBank 中仅有意大利蜜蜂的基因组和基因序列，而中华蜜蜂的基因组序列数据尚未完成。而且中华蜜蜂和意大利蜜蜂在蜜蜂属中是亲缘关系较近的两个种，理论上两者间基因组序列差异应该很小，因此，在本研究中我们以意大利蜜蜂的基因序列作为参考序列来分析基因的表达情况。在 Clean 标签中，两个样品中能够比对到参考意大利蜜蜂基因序列的标签总数分别为 1 896 575 和 1 857 672，分别占 31.72% 和 30.91%。能比对到参考基因的标签的种类数及百分比分别是 44 318 (占 37.18%)和 45 775(占 39.37%)。其中，所有 Clean 标签种类的 36.51% 和 38.66% 能比对到单一序列(图 4)。

2.3 飞行蜂王与未飞行蜂王间差异表达基因

为了检测飞行蜂王与未飞行性成熟处女蜂王间的差异表达基因，我们根据 Audic 和 Claverie (1997)描述的数字化基因表达谱差异基因检测方法，筛选两样本间的差异表达基因。在两组蜂王数据库中，总共检测到 250 个差异表达基因(图 5)，飞行蜂王与不飞行蜂王相比有 133 个上调表达基因和 117 个下调表达基因。其中，类别最多的为核糖体蛋白、线粒体核糖体蛋白、细胞色素以及丝氨酸蛋白酶。另外还发现：在飞行的中华蜜蜂处女蜂王中气味结合蛋白 9(OBP9)基因的表达量比未飞行的处女蜂王要高(表 2)。

2.4 差异基因的 GO 功能分析与 Pathway 富集分析

用 GO 分类分析这些差异表达基因所属的功能类别。对于 250 个差异表达基因，仅有 117 个基因有 GO ID，并按照细胞成分、分子功能和生化过程 3 个大类，共分为 348 个功能性类别。当把这些差

异表达基因与 GO 数据库进行比对并与整个基因组进行比较时，发现作用于糖基键的水解酶相关基因显著富集($P<0.05$)。

表 1　中华蜜蜂飞行蜂王(FMVQ)与未飞行蜂王(NFMVQ)数字化基因表达谱序列分析

Table 1　The DGE sequencing in the flying matured virgin queen (FMVQ) and non-flying matured virgin queen (NFMVQ) of *Apis cerana cerana*

类别 Summary	NFMVQ		FMVQ	
	标签总数 Total tag number	标签种类 Distinct tag number	标签总数 Total tag number	标签种类 Distinct tag number
原始数据 Raw data	6 123 579	228 005	6 104 196	241 625
Clean 标签 Clean tag	6 010 094	116 275	5 980 022	119 213
比对到参考基因的所有标签 All tags mapping to the reference genes	1 857 672 (30.91%)	45 775 (39.37%)	1 896 575 (31.72%)	44 318 (37.18%)
比对到唯一参考基因的标签 Unambiguous tags mapping to the unique reference gene	1 813 329 (30.17%)	44 947 (38.66%)	1 850 025 (30.94%)	43 522 (36.51%)
比对到基因组 Mapping to genome	1 228 394 (20.44%)	32 647 (28.08%)	1 056 523 (17.67%)	32 858 (27.56%)
未比对上的标签 Unknown tags	2 924 028 (48.65%)	37 853 (32.55%)	3 026 924 (50.62%)	42 037 (35.26%)

表中括号内的数据为其对应的标签总数或标签种类占 Clean 标签的比例。The numbers in parentheses indicate the percentage of total tag number or distinct tag number in clean tags.

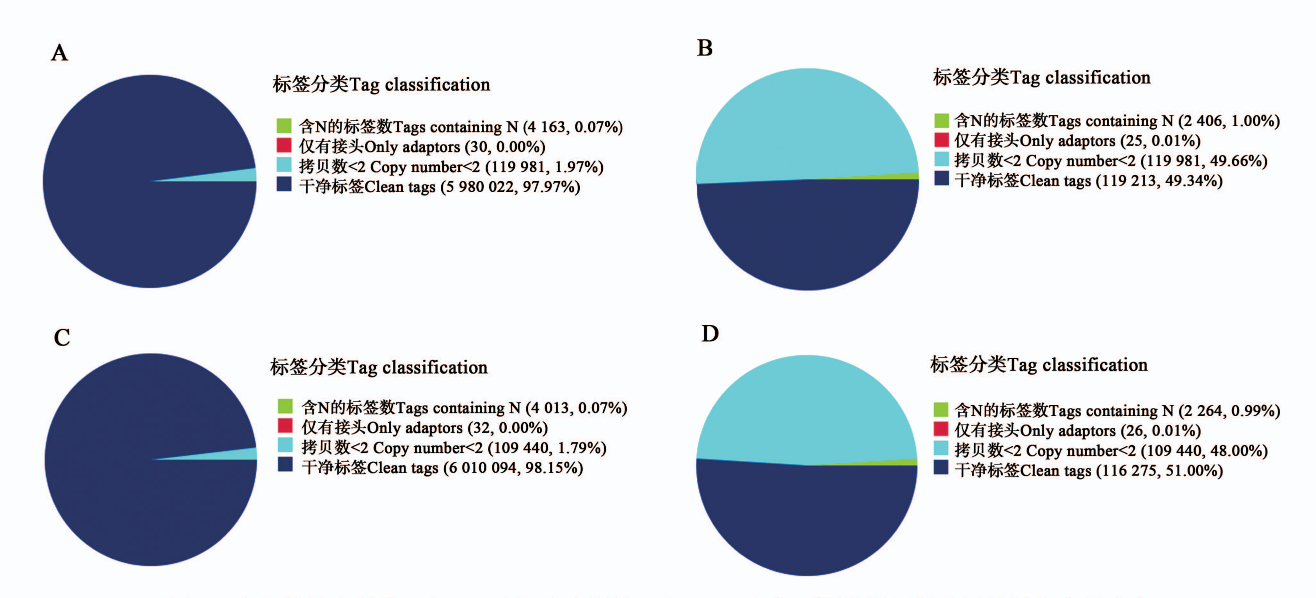


图 1　中华蜜蜂飞行蜂王(FMVQ)与未飞行蜂王(NFMVQ)中不同类别标签在原始标签中的分布

Fig. 1　Distribution of raw tags over different tag abundance categories in the flying matured virgin queen (FMVQ) and non-flying matured virgin queen (NFMVQ) of *Apis cerana cerana*

A：飞行蜂王标签总数分布 Distribution of total tags in FMVQ；B：飞行蜂王标签种类的分布 Distribution of distinct tags in FMVQ；C：未飞行蜂王标签总数分布 Distribution of total tags in NFMVQ；D：未飞行蜂王标签种类的分布 Distribution of distinct tags in NFMVQ. 括号内的数字表示每个类型的标签的总个数及所占的百分比。The numbers in parentheses indicate the total numbers and the percentage of tags of each type among the total raw tags.

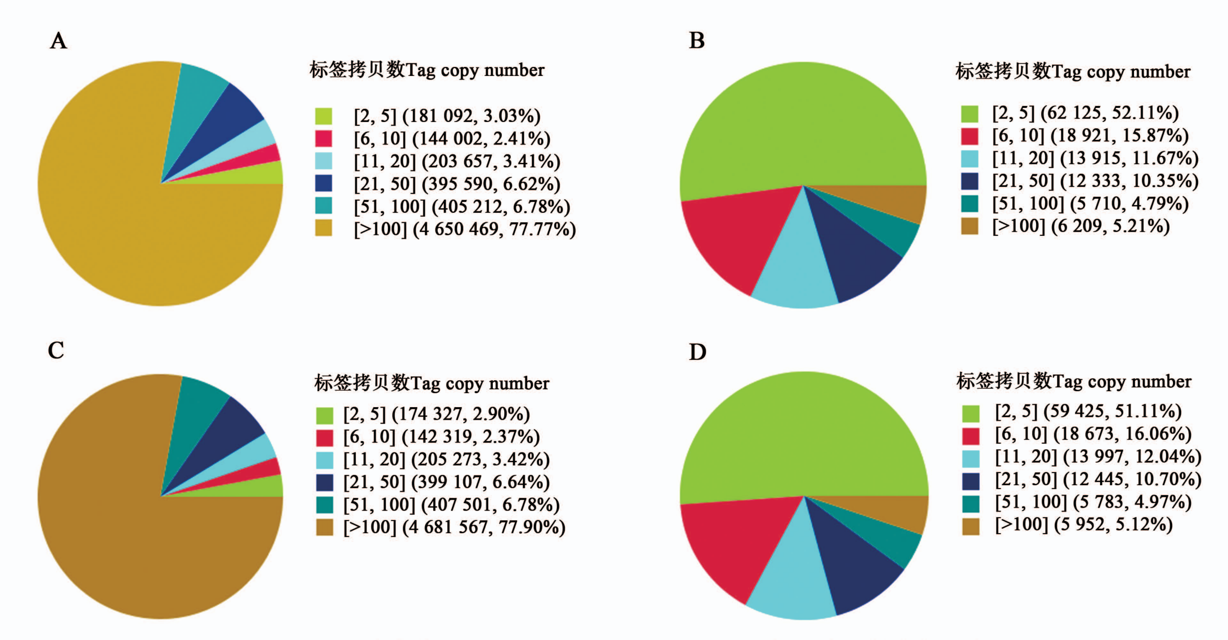


图 2 中华蜜蜂飞行蜂王和未飞行蜂王 Clean 标签拷贝数分布统计

Fig. 2 Distribution of clean tag copy number in the flying matured virgin queen (FMVQ) and non-flying matured virgin queen (NFMVQ) of *Apis cerana cerana*

A：飞行蜂王 Clean 标签总数分布 Distribution of total clean tags in FMVQ；B：飞行蜂王 Clean 标签种类的分布 Distribution of distinct clean tags in FMVQ；C：未飞行蜂王 Clean 标签总数分布 Distribution of total clean tags in NFMVQ；D：未飞行蜂王 Clean 标签种类的分布 Distribution of distinct clean tags in NFMVQ. 在方括号内的数字表示某一特定种类标签的拷贝数的范围；在括弧内的数字表示在这一类别中标签的总个数及占的比例。Numbers in the square brackets indicate the range of copy numbers for a specific category of tags, while the numbers in the parentheses show the total numbers and percentage of tags in that category.

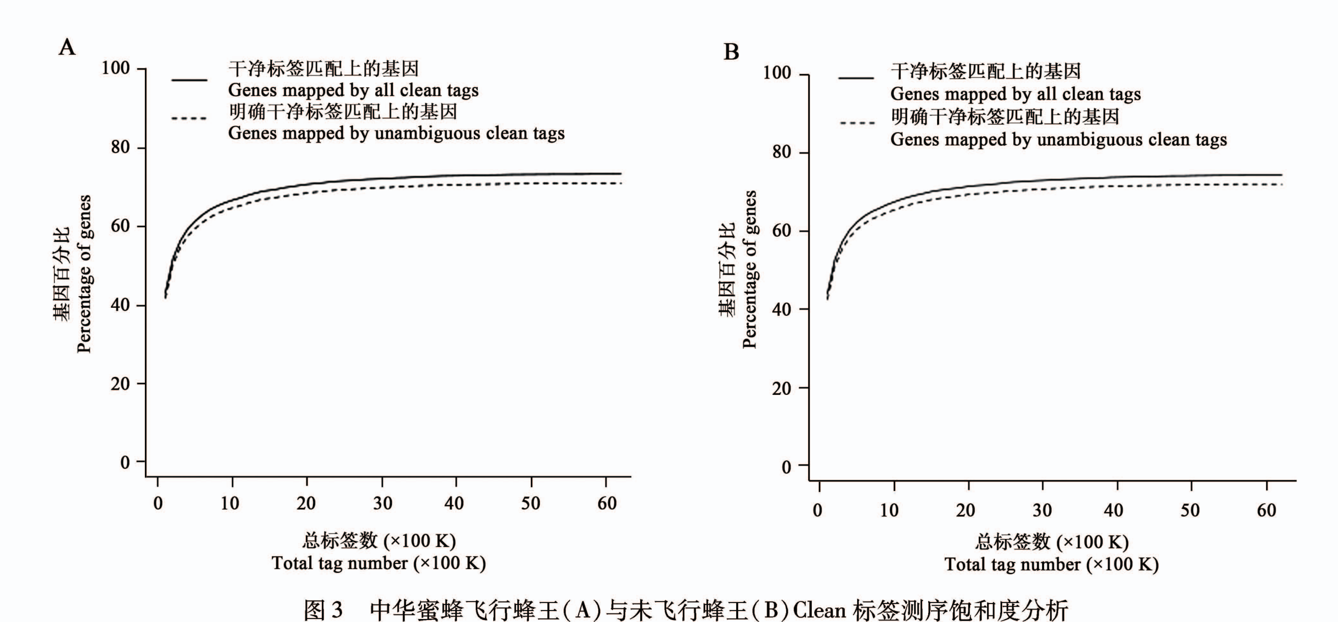


图 3 中华蜜蜂飞行蜂王(A)与未飞行蜂王(B)Clean 标签测序饱和度分析

Fig. 3 Sequencing saturation analysis of clean tags in the flying matured virgin queen (FMVQ) (A) and non-flying matured virgin queen (NFMVQ) (B) of *Apis cerana cerana*

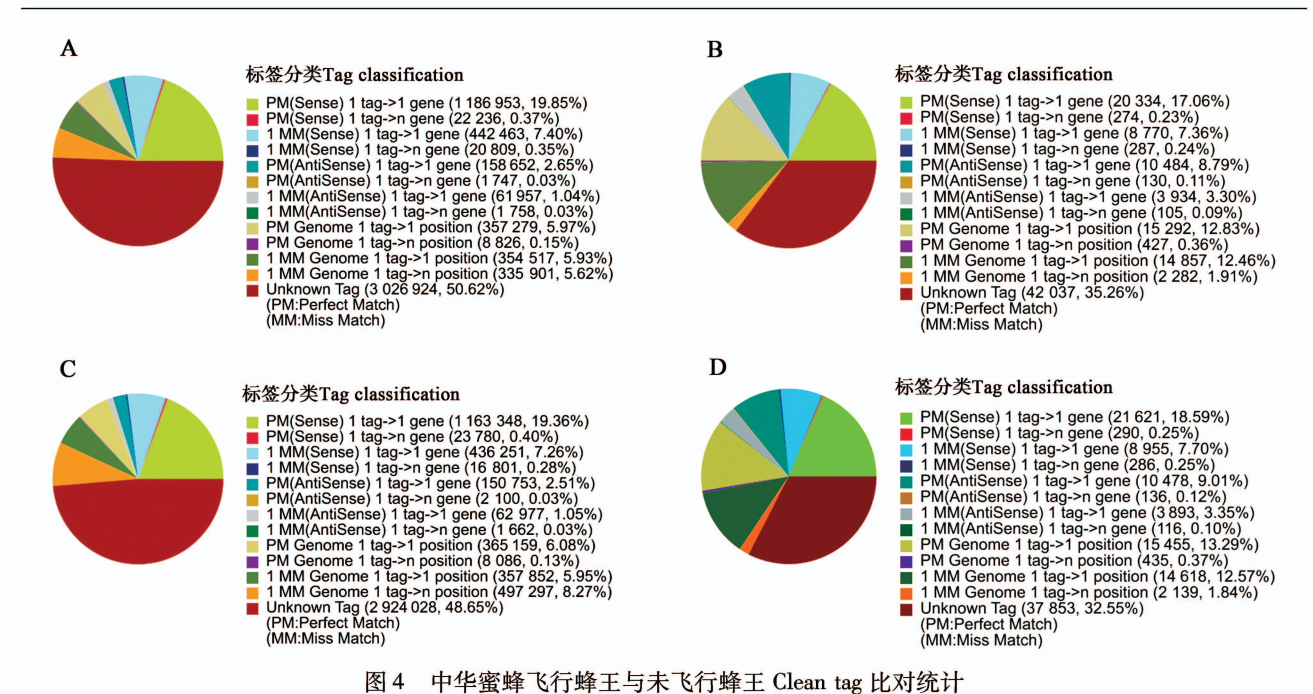


图 4　中华蜜蜂飞行蜂王与未飞行蜂王 Clean tag 比对统计

Fig. 4　Distribution of stat of clean tag alignment in the flying matured virgin queen (FMVQ) and non-flying matured virgin queen (NFMVQ) of *Apis cerana cerana*

A：飞行蜂王 Clean 标签总数比对到意大利蜜蜂基因和基因组序列的分布图 Distribution of total clean tags in FMVQ mapping to genes and genome of *Apis mellifera ligustica*；B：飞行蜂王 Clean 标签种类比对到意大利蜜蜂基因和基因组序列的分布图 Distribution of distinct clean tags in FMVQ mapping to genes and genome of *A. mellifera ligustica*；C：未飞行蜂王 Clean 标签总数比对到意大利蜜蜂基因和基因组序列的分布图 Distribution of total clean tags in NFMVQ mapping to genes and genome of *A. mellifera ligustica*；D：未飞行蜂王 Clean 标签种类比对到意大利蜜蜂基因和基因组序列的分布图 Distribution of distinct clean tags in NFMVQ mapping to genes and genome of *A. mellifera ligustica*.

表 2　中华蜜蜂飞行蜂王与未飞行蜂王差异表达基因

Table 2　The differentially expressed genes in the flying matured virgin queen (FMVQ) and non-flying matured virgin queen (NFMVQ) of *Apis cerana cerana*

基因 Gene	生成强度 Raw intensity		调控模式 Regulation model
	FMVQ	NFMVQ	
核糖体蛋白 S13 基因 RpS13 gene	4 501	2 070	+
核糖体蛋白 S26 基因 RpS26 gene	1 529	755	+
核糖体蛋白 L19 基因 RpL19 gene	568	184	+
核糖体蛋白 L23A 基因 RpL23A gene	2 591	1 159	+
线粒体核糖体蛋白 S17 基因 mRpS17 gene	92	43	+
线粒体核糖体蛋白 L16 基因 mRpL16 gene	197	83	+
细胞色素 P450 9Q1 基因 CYP9Q1 gene	260	125	+
细胞色素 P450 305D1 基因 CYP305D1 gene	244	118	+
细胞色素 P450 6AS10 基因 CYP6AS10 gene	166	8	+
丝氨酸蛋白酶 22 基因 SP22 gene	2 971	271	+
丝氨酸蛋白酶 35 基因 SP35 gene	44	3	+
丝氨酸蛋白酶 40 基因 SP40 gene	96	25	+
气味结合蛋白 9 基因 OBP9 gene	67	11	+
丝氨酸蛋白酶 23 基因 SP23 gene	46	175	–

+：基因表达上调 Up-regulated；–：基因表达下调 Down-regulated.

表 3 KEGG Pathway 差异显著性富集分析结果

Table 3 Result of KEGG Pathway enrichment analysis

通路 Pathway	注释到该通路的差异表达基因的数目 Number of DEGs with pathway annotation	注释到该通路的所有基因的数目 Number of genes with pathway annotation	*P* 值 *P*-value	*Q* 值 *Q*-value	通路 ID 号 Pathway ID
维生素消化与吸收 Vitamin digestion and absorption	8	56	4.03E－05	0.005716021	ko04977
胰腺分泌 Pancreatic secretion	12	148	0.000161257	0.011449233	ko04972
脂肪消化与吸收 Fat digestion and absorption	7	57	0.000326153	0.015437928	ko04975
甘油代谢 Glycerolipid metabolism	7	62	0.000550335	0.019536907	ko00561
代谢通路 Metabolic pathways	41	1100	0.001110727	0.031544647	ko01100

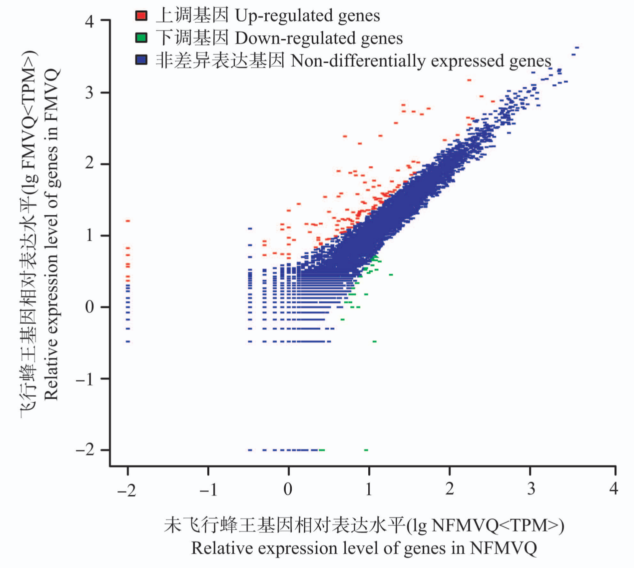


图 5 中华蜜蜂飞行蜂王与未飞行蜂王基因表达水平

Fig. 5 The expression level of genes in the flying matured virgin queen (FMVQ) and non-flying matured virgin queen (NFMVQ) of *Apis cerana cerana*

图中 TPM (transcripts per million clean tags)是一个标准化的指标，指每 100 万 Clean tag 中包含该种转录本的拷贝数。通过阈值 FDR < 0.001 和 $|\log_2 \text{Ratio}| > = 1$ (Ratio：飞行蜂王/未飞行蜂王)来确定有表达差异的基因；图中所示的红点则表示在飞行蜂王中上调的基因，绿色点则表示在飞行蜂王中下调基因，蓝色则表示在两种蜂王中表达差异不显著的基因。Transcripts per million clean tags (TPM) is a normalized index which denotes the number of a certain tag per million clean tags. The false-discovery rate (FDR) of < 0.001 and $|\log_2 \text{Ratio}| \geq 1$ (Ratio：FMVQ/NFMVQ) are used as the criterion to identify the differentially expressed genes. The red shows the up-regulated genes in FMVQ, the green represents the down-regulated genes in FMVQ, and the blue shows the non-differentially expressed genes between NFMVQ and FMVQ.

进一步研究这些差异表达基因所涉及的生化调节途径，我们把这些差异表达基因与 KEGG 数据库进行比对，发现这些基因能归类到 142 个生化途径，当将这些差异基因与整个基因组背景进行比较时，发现与维生素消化与吸收，胰腺分泌，脂肪消化与吸收，甘油代谢和代谢通路有关的基因显著性富集($Q < 0.05$)。

3 讨论

DGE 技术是利用新一代高通量测序技术和高性能计算分析技术，能够全面、经济、快速地检测某一物种特定组织在特定状态下相关基因表达情况，目前已广泛应用于基础研究，该技术也已经被运用于蜜蜂生物学特性的分子机制研究。Liu 等(2011)利用 DGE 分析了意大利蜜蜂哺育蜂和采集蜂差异表达基因。Wang 等(2012)研究了中华蜜蜂蜂王和工蜂之间的差异表达基因。Shi 等(2012)研究了营养杂交对基因表达的影响，等等。本研究利用 DGE 分析了中华蜜蜂飞行与未飞行的性成熟处女蜂王 mRNA 表达差异。从测序获取的 Tags 分析结果以及饱和度中可以看出，样品的测序结果较好。并且也发现飞行蜂王与未飞行蜂王在 Clean 标签数、Clean 标签种类以及相关基因具有明显的区别。

核糖体蛋白除参与核糖体构成和蛋白质合成之外，还在复制、转录、RNA 加工等过程中发挥重要作用，并在细胞的增殖、凋亡以及发育等多种调控

方面起作用(侯怡铃等，2010)。我们发现有 6 个核糖体蛋白基因在飞行的蜂王中上调表达。由于蜂王在婚飞交尾后卵巢被激活，卵巢迅速膨大，此时蜂王需要大量合成蛋白储存到卵里，所以推测这些核糖体蛋白基因的上调表达，可能与此时蜂王需要大量合成蛋白有关。

细胞色素 P450(简称 CYP450)是一类亚铁血红素——硫醇盐蛋白的超家族，它参与内源性物质和包括药物、环境化合物在内的外源性物质的代谢。作为一种末端加氧酶，参与了生物体内的甾醇类激素合成等过程(李芬和刘小宁，2012；肖调义等，2012)。本研究发现 3 个 CYP450 基因在飞行的蜂王中上调表达，这可能是由于蜂王为了吸引雄蜂与之交配，在飞行过程中释放更多的信息素或者释放某一种特殊的化学信息素，需要 CYP450 基因参与合成。具体有待于进一步研究与论证。

另外，在这些差异表达基因中我们发现有一个气味结合蛋白基因 *Obp*9（GenBank 登录号：NM_001040225.1)在飞行的蜂王中上调表达。气味结合蛋白是位于嗅觉感器淋巴液内里的一种水溶性的小分子蛋白，是嗅觉信号传导途径起始端的重要功能组分。它们的功能是将气味分子传输到分布于嗅觉神经树突状膜上的感受器上。而 *Obp*9 基因仅在较窄的发育历期中表达，一般仅在蜂王卵巢以及胚胎早期(李红亮，2007)，本研究发现 *Obp*9 基因在飞行蜂王中的表达量高于未飞行的蜂王，可能参与蜂王婚飞的过程中感受周围环境中气味的的变化。

丝氨酸蛋白酶是一类以丝氨酸为活性中心的重要蛋白水解酶，在生物有机体中起着重要而广泛的生理作用。在真核生物中，丝氨酸蛋白酶生理功能是间接完成的，是通过一系列的酶或蛋白质激活来完成，在这个激活过程中，有些丝氨酸蛋白酶成为上游激活因子，而另一些则成为下游执行因子(汪世华等，2007)。本试验研究发现，在性成熟处女蜂王飞行过程中，有 3 种丝氨酸蛋白酶基因表达上调，另一种丝氨酸蛋白酶基因表达下调。这也说明这 4 种丝氨酸蛋白酶在蜂王飞行过程中激活或抑制某些蛋白酶原，具体有待于进一步挖掘与验证。

参考文献（References）

Audic S, Claverie JM, 1997. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res.*, 7(10): 986 – 995.

He HL, Bin SY, Wu ZZ, Lin JT, 2012. Transcriptome characteristics of *Phyllotreta striolata* (Fabricius) (Coleoptera: Chrysomelidae) analyzed by using Illumina's Solexa sequencing technology. *Acta Entomologica Sinica*, 55(1): 1 – 11. [贺华良，宾淑英，吴仲真，林进添，2012. 基于 Solexa 高通量测序的黄曲条跳甲转录组学研究. 昆虫学报，55(1)：1 – 11]

Hou YL, Sun B, Hou WR, 2010. cDNA cloning and sequence analysis of ribosomal protein S26 gene (*rps*26) from the giant panda. *Journal of Beijing Normal University*, 46(2): 177 – 181. [侯怡铃，孙冰，侯万儒，2010. 大熊猫核糖体蛋白 S26 亚基基因(rps26)的 cDNA 克隆及序列分析. 北京师范大学学报，46(2)：177 – 181]

Kocher SD, Richard FJ, Tarpy DR, Grozinger CM, 2008. Genomic analysis of post-mating changes in the honey bee queen (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*, 9: 232.

Kocher SD, Tarpy DR, Grozinger CM, 2010. The effects of mating and instrumental insemination on queen honey bee flight behaviour and gene expression. *Insect Mol. Biol.*, 19(2): 153 – 162.

Li F, Liu XN, 2012. Review on insect gene promoter and cytochrome P450 gene promoters. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 24(5): 470 – 474. [李芬，刘小宁，2012. 昆虫基因启动子及细胞色素 P450 基因启动子研究进展. 生命科学，24(5)：470 – 474]

Li HL, 2007. Construction of the Head ESTs in *Apis cerana cerana*, and Its Main Antennal Proteins: Molecular Cloning, Immunocytochemical Localization and Expression. PhD Dissertation, Zhejiang University, Hangzhou. 139 pp. [李红亮，2007. 中华蜜蜂头部 ESTs 文库构建和主要触角特异蛋白基因克隆、定位及其表达鉴定. 杭州：浙江大学博士学位论文. 139 页]

Liu F, Li WF, Li ZG, Zhang SW, Chen SL, Su SK, 2011. High-abundance mRNAs in *Apis mellifera*: comparison between nurses and foragers. *Journal of Insect Physiology*, 57(2): 274 – 279.

Liu TT, 2012. *De novo* Sequencing of Transcriptome and Gene Expression Analysis of Female Honeybees in *Apis cerana cerana*. MSc Thesis, Jiangxi Agricultural University, Nanchang. [刘亭亭，2012. 中华蜜蜂转录组测序及雌性蜜蜂基因表达分析. 南昌：江西农业大学硕士学位论文]

Shi YY, Wu XB, Huang ZY, Wang ZL, Yan WY, Zeng ZJ, 2012. Epigenetic modification of gene expression in honey bees by heterospecific gland secretions. *PLoS ONE*, 7(8): e43727.

Wang SH, Wang WY, Huang YZ, Lin L, Sha L, 2007. On serine protease. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 22(4): 453 – 456. [汪世华，王文勇，黄益洲，林琳，沙莉,2007. 丝氨酸蛋白酶研究进展. 福建农业学报，22(4)：453 – 456]

Wang ZL, Liu TT, Huang ZY, Wu XB, Yan WY, Zeng ZJ, 2012. Transcriptome analysis of the Asian honey bee *Apis cerana cerana*. *PLoS ONE*, 7(10): e47954.

Xiao TY, Liu QL, Guo XZ, Zhang HY, Cui SL, Xu BH, Zhong L, 2012. Cloning and expression analysis of cytochrome P450 homolog from *Hyriopsis cumingii*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 36(5): 987 – 992. [肖调义，刘巧林，郭小泽，章怀云，崔树良，许宝红，钟蕾，2012. 三角帆蚌细胞色素 P450 基因的克隆与表达分析. 水生生物学报，36(5)：987 – 992]

Zeng ZJ, 2009. Apiculture. China Agriculture Press, Beijing. 1 – 5. [曾志将，2009. 养蜂学. 北京：中国农业出版社. 1 – 5]

（责任编辑：赵利辉）